

## APPLICATION NOTE

# 利用 SpectraMax Glo Steady-Luc Reporter 试剂盒检测荧光素酶的表达

## 简介

使用荧光素酶等报告基因等是高灵敏度且无损检测基因的表达一种手段。萤火虫荧光素酶是分子量为 61 kD 的单分子蛋白，由于其高灵敏度，线性检测范围广，背景低，在哺乳动物细胞中缺乏内源性发光活性，因此对许多研究人员特别具有吸引力。由于使用读板机检测荧光的方法越来越流行，因此高通量兼容的“辉光”检测方法常常是多板批量处理的首选方法。在本应用说明中，我们展示了使用 SpectraMax®Glo Steady-Luc™ 报告基因试剂盒检测 CHO-K1 细胞中荧光素酶的表达，该试剂盒提供了持久的发光信号。本实验试剂盒是针对 SpectraMax®i3x 多功能读板机进行优化的，并采用 SoftMax®Pro 软件中的配置的模板，用于快速数据分析。

## 材料与方法

- SpectraMax Glo Steady-Luc 报告基因试剂盒, Molecular Devices (Explorer kit #R8352 or Bulk kit #R8353)
- 对比试剂盒: Steady-Glo Luciferase Assay System, Promega (Cat# E2510)
- SpectraMax i3x 微孔板读板机, Molecular Devices (Cat# i3X)
- 96 孔白色底透板, Costar (Cat# 3903)
- 纯化荧光素酶, Promega (Cat# E1701)
- 384 孔白色微孔板, Greiner (Cat# 655075)
- CHO-K1 细胞, ATCC (Cat# CCL-61)
- 完全培养基
  - Ham's F12 培养基, Life Technologies (Cat# 11765-54)

- 牛血清, Gemini (Cat# 100-106)
- 盘尼西林 / 链霉素, Life Technologies (Cat# 15070-063)
- 0.05% 胰蛋白酶 EDTA, Life Technologies (Cat# 25300-054)
- pGL4 萤火虫荧光素酶载体, Promega (Cat# E6681)
- pGL3 空白载体, Promega (Cat# 1741)
- FuGeneHD 转染试剂, Promega (Cat# E2311)

## 方法

SpectraMax Glo Steady-Luc Reporter 实验有一个简化的工作流程。微孔板的每一个孔内都放入表达荧光素酶的细胞并加入工作液与培养基 1:1 混合后的溶液。在使用 SpectraMax i3x 多功能读板机读取发光信号前，避光并混匀使细胞完全裂解。使用 Softmax Pro 软件中内置的模板，数据采集和分析很容易简化。

## 优势

- 基于辉光的发光技术提供了一个宽广的信号时间窗，在筛选类实验中可以批量处理微孔板
- 针对 SpectraMax 荧光读板机已优化
- 使用 SoftMax Pro 软件内置的模板可以简化数据的获取和分析

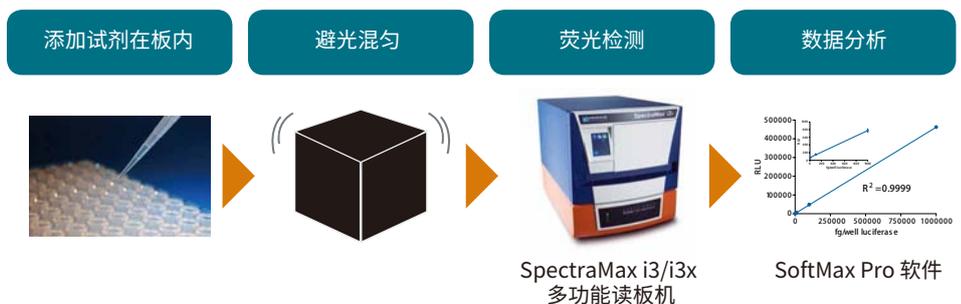


图 1 SpectraMax Glo Steady-Luc Reporter 试剂盒工作流程

### 荧光素酶标准曲线

为了确定该方法的线性检测范围，我们构建了一条标准曲线来测量荧光素酶浓度与 RLU 的关系。首先将 SpectraMax Glo Steady-Luc Reporter 试剂盒的所有试剂放置在室温下平衡。将 D-Luciferin 以 1 mg - 4 mL 的比例添加到 Steady-Luc 缓冲液中，制得 SpectraMax Glo Steady-Luc 工作液。将 PBS 溶解的纯化荧光素酶以  $1 \times 10^6$  fg/well 起始浓度做 10 倍梯度稀释，每个浓度的溶液取 25  $\mu$ L 放入 384 孔白色微孔板，做 3 个复孔。25  $\mu$ L 对照品与 SpectraMax Glo Steady-Luc 工作液都加入到微孔板后，震荡摇匀并避光放置 10 min。使用 SpectraMax Glo Steady-Luc Reporter 内置的 SpectraMax Glo Steady-Luc Reporter 实验模板设定程序并通过 SpectraMax i3x 读板机检测发光。检测结束后，模板会根据数据自动生成一条曲线。

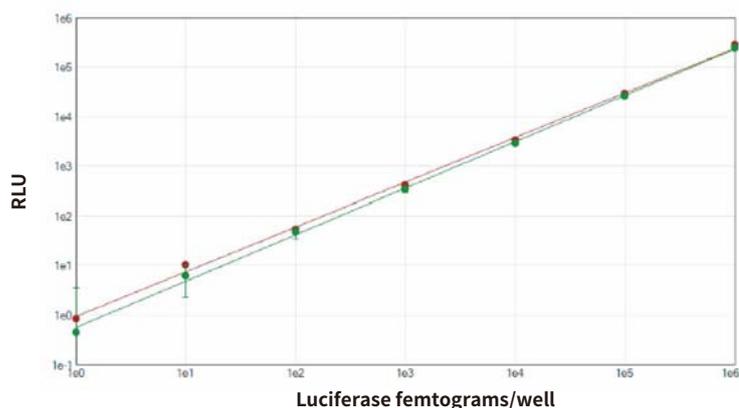


图 2 荧光素酶在 384 孔板内的标准曲线。直线是利用 SpectraMax Glo Steady-Luc Reporter 试剂盒 (绿色) ( $R^2 = 0.999$ ) 和相似试剂盒 (红色) ( $R^2 = 0.998$ ) 检测 10 倍梯度稀释纯化荧光素酶的数据绘制而成。二者的最低检测限均为 5 fg / 孔。

### 转染及细胞稀释实验

部分报告基因实验的方法开发实验是为了优化细胞数目和质粒数量，从而为筛选提供可靠的信号。细胞稀释实验是在 6 孔板上使用两种不同数量的 pGL4.13 萤火虫荧光素酶进行。每个孔使用 1.7  $\mu$ g, 0.8  $\mu$ g pGL4.13 [luc2/SV40] 载体以及 pGL3 空白载体转染 CHO-K1 细胞，其中 pGL4.13 [luc2/SV40] 载体编码了荧光素酶基因 luc2 并在前面连接了 SV40 早期增强子 / 启动子，而 pGL3 空白载体缺少启动子和增强子序列。24 小时以后，使用胰蛋白酶将细胞消化并以 30000 细胞 / 孔的起始数量 2 倍稀释，在 96 孔板内放入每孔 100  $\mu$ L。每孔再加入 100  $\mu$ L 的 Steady-Luc 工作液。整板避光并使用圆周型振荡器充分混匀。10 min 过后，使用 SpectraMax i3x 读板机内置的 SpectraMax Glo Steady-Luc Reporter 实验模板检测发光。该内置的模板可在 Protocol Library 标签下的 Reporter Assay 中，或是在 SoftMax Pro 软件模板分享网站中找到 ([www.softmaxpro.org](http://www.softmaxpro.org))。

### 筛选类应用

使用 SpectraMax Glo Steady-Luc Reporter 试剂盒对转染 pG l4 萤火虫荧光素酶的细胞平板进行多次读取，模拟报告基因检测筛选。细胞如前所述转染，在 96 孔板中以每孔 30,000 个细胞的密度铺板，并过夜生长。在实验当天将细胞板放置在室温平

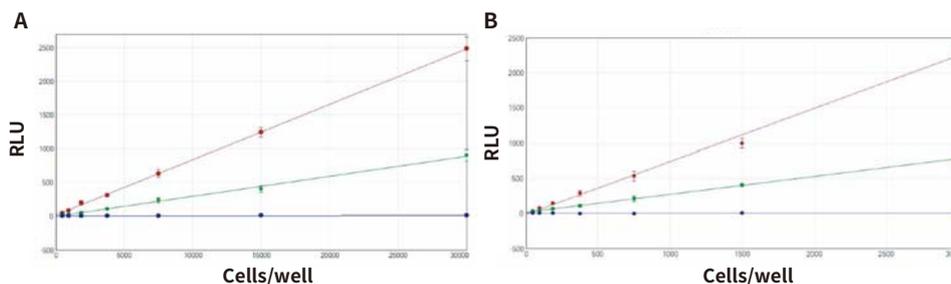


图 3 转染细胞的荧光素酶测定。铺板的 90% 的 CHO-K1 细胞被 1.7  $\mu$ g pGL4 (萤火虫) (红色), 0.8  $\mu$ g pGL4 (萤火虫) (绿色) 或 pGL3 (对照) 荧光素酶质粒 (蓝色) 转染。(A) SpectraMax Glo Steady-Luc Reporter 实验 ( $R^2 > 0.995$  在 0.8  $\mu$ g 质粒) 和 (B) 类似实验 ( $R^2 = 0.999$  在 0.8  $\mu$ g 质粒)。两种试剂盒在实验中检测的最小的细胞数目是 468 细胞 / 孔。

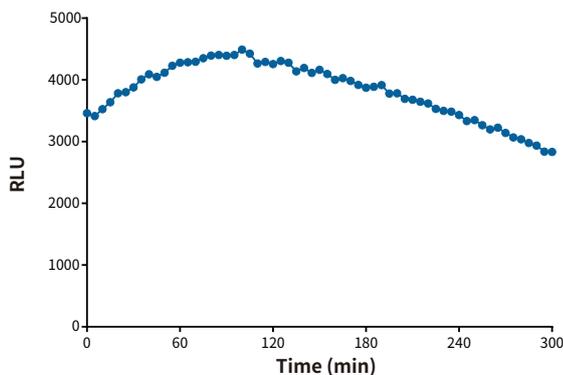


图 4 CHO-K1 细胞内荧光素酶信号随时间的动态变化。CHO-K1 被转染表达荧光素酶。在实验当天，微孔板放置在室温平衡，然后在每个孔加入 100  $\mu$ L 重建的包含 D-Luciferin 的 Steady-Luc 工作液。微孔板在圆周振荡器上避光混匀 5 min，然后放入 SpectraMax i3x 读板机内混匀。发光信号在 5 小时内每 5min 读数 1 次，并在每次读数前震荡。

衡, 然后每个孔加入 100  $\mu$ L 重组的含有 D-Luciferin 的 Steady-Luc 工作液。将细胞板避光并放置在圆周型振荡器上混匀 5 mins, 然后放置在 SpectraMax i3x 读板机内混匀。每 5 分钟读取一次发光信号, 每次读取前进行 3 秒的圆周式震动, 总共持续 5 个小时。

## 结果

### 荧光素酶标准曲线

为了进行比较, 我们还使用了竞争对手的 glow luciferase 实验来确定标准曲线的检测范围。在这两种情况下, 荧光素酶的测定结果都与荧光素酶浓度呈线性关系 (图 2)。使用 SpectraMax Glo Steady-Luc Reporter 试剂盒测定荧光素酶  $R^2$  值为 0.998, 使用竞争对手试剂盒测定荧光素酶  $R^2$  值为 0.999。归一化数据的双侧 t 检验表明各浓度下结果相同 ( $P < 0.05$ )。计算结果是通过 GraphPad Prism 软件获得。两种试剂盒在 384 孔板上对荧光素酶的最低检测限 (LLD) 均为 5 fg / 孔。

### 转染细胞的荧光素酶测定

将荧光素酶瞬时转染 CHO-K1 细胞, 从 30,000 个细胞 / 孔开始, 用枪滴入孔中, 然后添加 Steady-Luc Reporter 工作液。如图 3 所示, SpectraMax Glo Steady-Luc Reporter 实验和竞争对手 glow luciferase 实验都显示了细胞数量与发光之间的线性关系。在 0.8  $\mu$ g pGL4.13 转染的细胞中, 使用 SpectraMax Glo Steady-Luc Reporter 试剂盒检测的荧光素酶  $R^2$  值为 0.995, 使用竞争对手试剂盒的  $R^2$  值大于 0.995。两种试剂盒在实验中检测的最低细胞浓度为 468 细胞 / 孔。

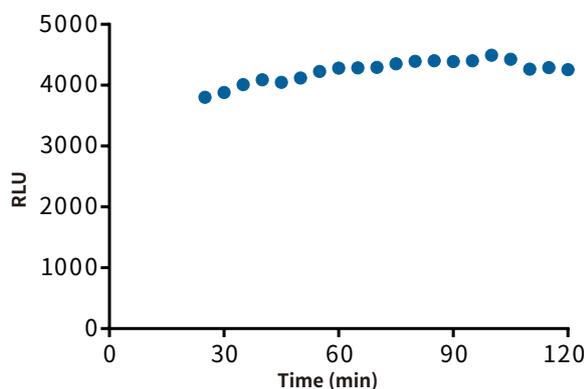


图 5 筛选类应用。转染荧光素酶的 CHO-K1 细胞在 SpectraMax Glo Steady-Luc 中的原始数据。荧光素酶转染细胞每 5 mins 读取的平均信号被绘制, 当作一个筛选实验里批次处理的微孔板。在筛选板上, 使用背景对照对数据做归一化处理, 从而多块板之间可以进行比较。

### 筛选类应用

The SpectraMax Glo Steady-Luc Reporter 实验是一种基于荧光的发光实验, 提供了较长的时间窗口 (图 4)。一块含有表达荧光素酶的 CHO-K1 细胞 (30,000 细胞 / 孔) 的微孔板每 5 mins 读数一次以模拟批量操作的筛选类实验。5 小时时, 信号在初始值的 20% 以内。在报告基因筛选的实验中每一块板上都包含一个对照作为背景值, 以便多个板之间比较数据。如图 5 所示, 20 块板的信号值变化在 15% 以内, 这说明在 90 min 内读取 20 块板的可行性。

### 结论

使用化学发光微孔板读板机完成基于荧光素的报告基因实验在高通量生物化学以及药物筛选中越来越受欢迎。SpectraMax Glo Steady-Luc Reporter 实验试剂盒可以灵敏的定量检测到哺乳动物细胞中萤火虫荧光素酶的表达。通过采用均质的实验方案, 本试剂盒中特殊配制的混合物质显著延长了时间窗, 且信号稳定, 从而实现了筛选类实验中微孔板的批量处理。该检测试剂盒是针对美谷分子仪器的微孔板读板机优化设计, 在美谷分子的 SoftMax Pro 软件上已预置一个模板提供给用户, 方便数据的获取及分析。



更多精彩内容  
尽在官方微信

### 美谷分子仪器 (上海) 有限公司

全国咨询服务热线: 400-820-3586  
上海 电话: 86-21-3372 1088  
北京 电话: 86-10-6410 8669  
成都 电话: 86-28-6558 8820  
台北 电话: 886-2-2656 7585  
香港

www.MolecularDevices.com.cn  
Email: info.china@moldev.com  
传真: 86-21-3372 1066  
传真: 86-10-6410 8601  
传真: 86-28-6558 8831  
传真: 886-2-2894 8267  
传真: 852-2289 5385

地址: 上海市长宁区福泉北路 518 号 1 座 501 室 200335  
地址: 北京市朝阳区广渠东路 3 号中水电国际大厦 612 & 613 室 100124  
地址: 成都市锦江区东御街 18 号百扬大厦 2208 室 610016  
地址: 台北市内湖区堤顶大道二段 89 号 3 楼  
地址: 香港中环皇后大道中 15 号置地广场 公爵大厦 21 楼

